# El alcoholismo crónico en la morfología de estructuras testiculares en la rata

**Aymara Gómez González y Andrés Dovale Borjas.***

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" Avenida 27 No. 12023, entre 120 B y 122, Marianao, *Avenida 17 No. 19402 entre 194 y 198, Playa Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 10 de agosto de 1999. Aceptado: 5 de junio del 2000.

Palabras clave: túbulos seminíferos, células de Leydig, morfometría, cariometría.
Key words: seminiferous tubules, Leydig cells, morphometry, karyometry.

**RESUMEN.** La ingestión crónica de alcohol provoca un descenso de las concentraciones plasmáticas de testosterona, hecho que se asocia con disfunciones sexuales tales como impotencia y esterilidad. Aunque el estudio histológico de los testículos en los individuos alcohólicos ha demostrado disminución de su peso y modificaciones del diámetro y morfología de los túbulos seminíferos, no se han hallado alteraciones citológicas de las células de Leydig productoras de testosterona. Con el objetivo de evaluar los efectos del alcohol sobre la morfología de dichas estructuras testiculares se realizó un estudio con 30 ratas albinas Wistar de 10 semanas de edad. Diez de los animales consumieron alcohol al 10 % en el agua de consumo durante 12 semanas y otros diez siguieron el tratamiento por 24 semanas; los diez animales restantes constituyeron los controles. Al finalizar el tratamiento, se extrajeron los testículos, se pesaron aislados del epidídimo y se procesaron mediante la técnica histológica de hematoxilina y eosina. Se midió el diámetro transversal menor de los túbulos seminíferos y se realizó la cariometría de las células de Leydig con el empleo de un ocular micrométrico de 10×. Para el procesamiento de los datos se confeccionó un programa para estudios morfométricos que permitió calcular el área de la sección transversal tubular y el volumen nuclear celular a partir de los datos recogidos. Se encontró una disminución del peso testicular y del volumen nuclear de las células de Leydig en los animales experimentales, pero en cambio no se afectó significativamente el área de la sección transversal tubular. Aunque los valores obtenidos no fueron estadísticamente significativos, estos resultados son congruentes con la disminución de las concentraciones plasmáticas de testosterona encontrada en pacientes alcohólicos.

**ABSTRACT.** Chronic alcohol ingestion results in a decrease in serum testosterone levels associated with sexual dysfunction, impotence and sterility. Diminished testicular weights and disturbances in the morphology and diameter of seminiferous tubules have been reported in alcoholic male rats, but the cytological features of the Leydig cells do not seem to be affected. In order to evaluate the alcohol-induced testicular damage, 30 ten-week-old, male Wistar rats, have been studied. Ten of the animals were fed 10 % alcohol in their drinking water during 12 weeks; another ten, for 24 weeks and the rest of the animals were the controls. At the end of the treatment the testicles were extracted, isolated from the epididymis, weighed, and processed with hematoxilin and eosin. The transversal diameter of the seminiferous tubules and the karyometry of Leydig cells were measured using a 10× micrometric ocular. A software program for morphometric studies for data processing was created. This software made it possible to calculate the cross-section area of the seminiferous tubules and the nuclear volume of Leydig cells. A decrease of testicular weights and Leydig cells nuclear volume reduction was found, but the cross-section area of the seminiferous tubules was not affected by alcohol consumption. Although the obtained values had not statistical significance, these results are congruent with the decrease of serum testosterone levels found in alcoholic patients.

## INTRODUCCION

El alcoholismo es una toxicomanía que afecta principalmente a la población adulta masculina y se encuentra asociada con diversos trastornos entre los que se destacan, por su importancia médica y social, las disfunciones sexuales.[1] Entre las alteraciones más frecuentes se reporta disminución del deseo sexual,[2] disfunciones eréctiles e infertilidad.[1]

El consumo crónico de alcohol provoca además, disminución del peso y volumen testiculares, atrofia testicular, reducción del diámetro de los túbulos seminíferos y grado variable de fibrosis peritubular.[3-6] Con relación a dichas afecciones, se ha reportado una disminución de las concentraciones séricas de testosterona asociada con la inhibición directa de la esteroidogénesis en las células de Leydig.[6,7] Aunque hay evidencias de que el alcoholismo crónico inhibe la síntesis y liberación de testosterona, algunos autores plantean que no provoca alteraciones citológicas de dichas células,[3,4,6] sin embargo, no se han encontrado referencias a su análisis morfométrico, lo cual podría aportar una información más objetiva sobre el estado de funcionamiento celular.

Por lo anterior, este trabajo se propuso evaluar los efectos del consumo crónico de alcohol sobre el área de la sección transversal de los túbulos seminíferos y el volumen nuclear de las células de Leydig en la rata.

## MATERIALES Y METODOS

### Animales y tratamiento

Se seleccionaron 30 ratas albinas Wistar macho de 10 semanas de edad (170-215 g de peso corporal), aparentemente sanas, adultas (Bioterio del Instituto Superior de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"). Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en dos grupos, cada uno de los cuales estuvo integrado por diez experimentales y cinco controles. A su vez, cada grupo experimental consumió alcohol etílico 10 % en el agua de consumo (10 g/100 mL) durante 12 y 24 semanas respectivamente, mientras que los controles recibieron agua *ad libitum*. El líquido se suministró en jeringuillas plásticas de 50 mL, lo que permitió comprobar el consumo diario de la droga.

### Procesamiento histológico y análisis morfométrico

Al finalizar el tratamiento, los animales se sacrificaron previa anestesia con pentobarbital sódico a razón de 40 mg/kg por vía intraperitoneal. Los testículos se extrajeron y pesaron aislados del epidídimo en una balanza analítica BLA-200$_2$-MT, se fijaron por inmersión en líquido de Bouin durante 24 h y se procesaron mediante la técnica de la parafina. Los cortes a 6 $\mu$m se colorearon con hematoxilina y eosina y se observaron en un microscopio Carl-Zeiss. Se midió el diámetro transversal menor de más de 100 túbulos seminíferos en cada animal, con el empleo de un ocular micrométrico 7× y un objetivo 40×.

Para la cariometría de las células de Leydig, se midieron los diámetros mayor y menor de más de 100 núcleos celulares que presentaron nucléolos manifiestos, mediante un ocular micrométrico 7×, un objetivo de inmersión 100×y optovar 1,6. Para el cálculo del *área de la sección transversal tubular* y del *volumen nuclear de las células de Leydig* a partir de los datos *diámetro transversal tubular menor* y *diámetros nucleares mayor y menor* respectivamente, se concibió, diseñó y elaboró un programa para la realización de estudios morfométricos "MFT"en lenguaje Turbo Basic,[8] que calcula el *volumen nuclear* según la fórmula:[9]

$$V_{nuclear} = 1/6\ \pi L B^2$$

donde:

L y B diámetros menor y mayor.

El cálculo de las medias se realizó en cada caso y en cada grupo y se determinó además, la desviación estándar de cada grupo.

### Análisis de los datos

Las variables *área de la sección transversal tubular* y *volumen nuclear de células de Leydig* fueron almacenados en bases de datos elaboradas mediante el programa computadorizado Fox Pro 2.5. Para estudiar el efecto de la administración de alcohol y del tiempo sobre dichas variables, se practicó un análisis de varianza de dos vías que incluyó como efectos principales, el tiempo y el alcoholismo "anidado" en el tiempo. Este análisis se llevó a cabo mediante el paquete de programas comercial Systat 7.0.

## RESULTADOS

El programa "MFT" facilitó la realización de los cálculos morfométricos de las estructuras medidas con el ocular micrométrico.

Los animales tratados por 12 semanas tuvieron un mayor consumo promedio diario de alcohol que los tratados por 24 semanas. Los pesos testiculares de las ratas alcoholizadas fueron discretamente menores, aunque el análisis de varianza aplicado a todos los grupos evidenció que dicha disminución no fue significativa. La estructura histológica de los testículos fue similar en ambos grupos. El grosor de la pared y las características del epitelio seminífero fueron aparentemente normales. El área de sección transversal tubular fue ligeramente menor en el grupo de ratas tratadas por 12 semanas. (Fig. 1) Aunque dicha variable fue discretamente mayor en el grupo tratado por 24 semanas que en su respectivo control, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, como evidencia el análisis de varianza aplicado a todos los grupos. El aspecto histológico de las células de Leydig fue aparentemente normal en todos los grupos. Los volúmenes nucleares medios de dichas células fueron menores en todas las ratas alcoholizadas, aunque el análisis de varianza indicó que éstos no fueron significativamente afectados por el tratamiento (Fig. 2).

## DISCUSION

Numerosas investigaciones microscópicas morfológicas requieren del empleo de métodos cuantitativos morfométricos que contribuyan a validar los resultados, los que de esta forma pueden ser comparados mediante diferentes pruebas estadísticas. Entre los métodos más empleados se encuentra la cariovolumetría,[10] pero el procesamiento manual de los datos obtenidos mediante éstos es sumamente laborioso y está sujeto a múltiples errores. Aunque en el mundo y en centros de elevado desarrollo de Cuba existen equipos de avanzada tecnología que permiten realizar tales estudios mediante la digitalización de imágenes,[11-14] éstos no están al alcance de la mayoría de los centros donde se realizan estas investigaciones, son de elevado costo y no están exentos de dificultades técnicas en su utilización. Con la creación del nuevo programa MFT, todo aquel que tenga acceso a una microcomputadora IBM compatible puede realizar el análisis de los datos primarios obtenidos mediante los métodos micromorfométricos más utilizados.

La disminución de los pesos testiculares en ratas alcoholizadas ha sido referida por otros autores.[1-6] Van Thiel y col. estudiaron los efectos del alcohol sobre la estructura y función testicular en ratas tratadas

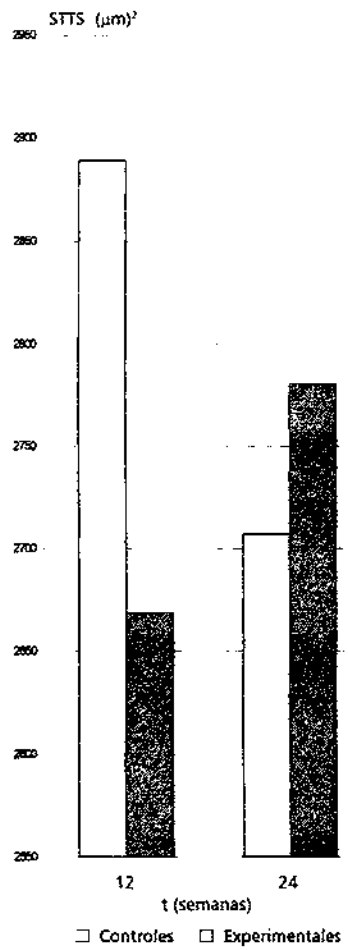


*Fig. 1. Area de la sección transversal de los túbulos seminíferos (STTS)en ratas que recibieron alcohol y en controles en dos períodos de tratamiento.*

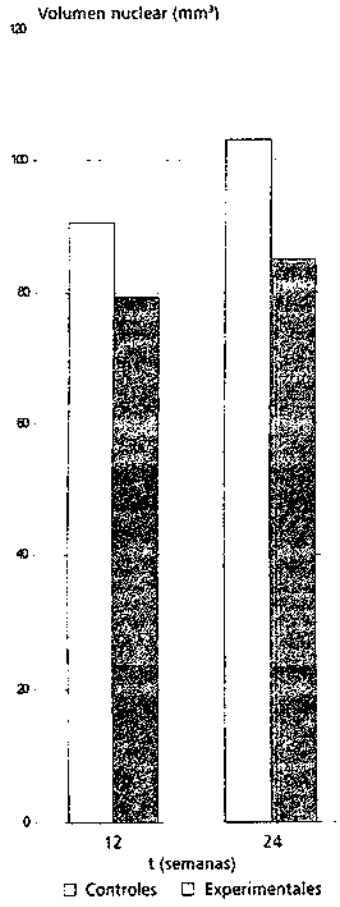


*Fig. 2. Volumen nuclear de células de Leydig en ratas que recibieron alcohol y en controles en dos períodos de tratamiento.*

por 164 d (23,4 semanas) y encontraron una reducción de más del 50 % del peso de los testículos, que fue atribuida a una reducción del área de la sección transversal de los túbulos seminíferos y de la cantidad de epitelio germinativo.[6] En el presente trabajo, aunque se encontró disminución del peso de los testículos, no se halló una reducción significativa del área de sección transversal tubular. Esos mismos autores reportaron una marcada reducción de la masa testicular relativa al peso corporal en ratas de 20 d de nacidas tratadas con dieta líquida durante 41 d (36 % del total de calorías aportadas por el alcohol),[4] pero este experimento, al realizarse durante la etapa de maduración sexual de los animales, pudo haber perjudicado el crecimiento testicular.

Aunque ha sido referido por algunos autores que el tratamiento crónico con alcohol provoca reducción del área de la sección transversal de los túbulos seminíferos,[4,6] en este experimento la ingestión de alcohol 10 % durante 12 y 24 semanas no la afectó significativamente, si bien ésta fue menor en el grupo tratado por 12 semanas. Ello pudiera explicarse por ser este grupo el de mayor consumo promedio diario de alcohol. Van Thiel y col.[4] relacionaron la reducción del diámetro tubular con la pérdida de celularidad del epitelio germinativo secundaria a la disminución de testosterona. Recientemente otros autores atribuyen este efecto al déficit de ácido retinoico indispensable para el desarrollo de dicho epitelio.[15] Los resultados del presente trabajo no coinciden con lo reportado por estos autores debido, probablemente, a la menor concentración de alcohol empleada.

Los volúmenes nucleares de las células de Leydig fueron menores en los grupos de animales alcoholizados aunque no se afectaron significativamente por el tratamiento. Esto pudiera deberse al pequeño tamaño de la muestra y a la baja concentración de alcohol empleada. La disminución del volumen nuclear de las células secretoras se interpreta como un signo de menor actividad sintética;[10] como en este caso el núcleo controla la síntesis y secreción de testosterona, el descenso en la producción de dicha hormona justificaría la disminución del volumen nuclear.[10]

## CONCLUSIONES

El consumo de alcohol 10 % en el agua de beber durante 12 y 24 semanas provoca disminución de los pesos testiculares, pero no afecta significativamente la morfología de este órgano. El volumen nuclear de las células de Leydig resulta discretamente menor en las ratas tratadas que en sus respectivos controles. El área de la sección transversal de los túbulos seminíferos no mostró variaciones significativas entre ambos grupos. Estos resultados coinciden con la disminución de las concentraciones plasmáticas de testosterona reportados en individuos alcohólicos y en experiencias similares.

Fue concebido y diseñado un programa de computación (denominado MFT) que permite realizar el análisis de estudios microscópicos morfométricos practicados con ocular micrométrico.

## BIBLIOGRAFIA


1. Taniguchi N. and Kaneko S. Alcoholic effect on male sexual function. **Nippon Rinsho, 55**, 3040, 1997.
2. Bergman B.O. and Brismar B.O. Cohabiting relationships and sexual interest of male alcoholics. **Journal of Addictive Diseases, 15**, 53, 1996.
3. Van Thiel D.H., Lester R. and Sherins R.I. Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. **Gastroenterology, 67**, 1188, 1974.
4. Van Thiel D.H., Gavaler J.S., Lester R. and Goodman M.D. Alcohol induced testicular atrophy. An experimental model for hypogonadism ocurring in chronic alcoholic men. **Gastroenterology, 69**, 326, 1975.
5. Calleja J., Rodríguez L.A., Fernández del Busto E. y Vaquero C. Alteraciones testiculares producidas por el alcohol. **Actas Urológicas Españolas, 21**, 337, 1997.
6. Van Thiel D.H., Gavaler J.S., Cobb C.F., Sherins R.J. and Lester R. Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. **Endocrinology, 105**, 888, 1979.
7. Adams M.L. and Cicero T.J. Effects of alcohol on β-endorphin and reproductive hormones in the male rat. **Alcoholism Clinical and Experimental Research, 15**, 685, 1991.
8. Borland International, Inc., Turbo Basic. Versión 1.0, 1987.
9. Palkovits M. Quantitativ Histologische Methoden in Verbindung mit den Schiddruse und ihre vergluchende Bewertung. **Endokrinologie, 45**, 227, 1973.
10. Szentágothai J., Flerkó B., Mess B. and Halász B. Hypothalamic control of the anterior pituitary. 3rd Ed., Akadémiai Kiadó, Budapest, 130, 1968.
11. Bertram J.F. Analyzing renal glomeruli with the new stereology. **International Review of Citology, 161**, 111, 1995.
12. Avila V. COMSDI. Manual de usuario. Versión 2.0, Holguín, 1, 1994.
13. Eng A. SASUDI. Manual de usuario Versión 2.0, Holguín, 1-10, 1994.
14. Coro Artich R.M. Borrajero I. DIGIPAT, un sistema cubano para morfometría de imágenes. **Revista Latinoamericana de Patología, 34**, 9, 1996.
15. Deltour L., Haselbeck R., Hwee-Luan-Ang, Duester G. Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epidydimis: Potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. **Biology of Reproduction, 56**, 102, 1997.